

腫瘍内浸潤リンパ球の rIL-2 添加培養と 細胞傷害活性の研究

岡山大学医学部第一外科学教室 (指導: 折田薫三教授)

松 本 三 明

(平成 7 年 6 月 30 日受稿)

Key words: 腫瘍内浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes; TIL), recombinant interleukin-2 (rIL-2), 細胞傷害活性, リンパ球表面抗原, パーフォリン

緒 言

悪性腫瘍に対する養子免疫療法には、末梢血単核細胞を recombinant interleukin-2 (rIL-2) と培養することによって得られる lymphokine activated killer (LAK) 細胞を担癌生体に移入し、抗腫瘍活性を期待する LAK 療法があり臨床応用されて久しい¹⁻⁵⁾。しかし LAK 療法の効果は有効例の報告が散見されるものの^{4,5)}、一定しておらず満足されるものではない。その要因としては、LAK 細胞を体内に移入した時そのほとんどが肺、肝、脾に分布し腫瘍局所にはあまり集積しないためと、その抗腫瘍活性が広範で非特異的であるためと考えられる⁶⁾。一方従来より舌癌、乳癌、胃癌などの腫瘍内に浸潤しているリンパ球の程度と予後には相関があることが知られており^{7,8)}、腫瘍に対する免疫学的応答と考えられてきた。これらのリンパ球は腫瘍内浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes; TIL) と呼ばれ、近年その特性についての研究が進んでいる。Rosenberg らは腫瘍組織より分離した TIL を rIL-2 と共に培養し抗腫瘍活性を調べたところ、LAK 細胞より 50~100 倍の抗腫瘍活性を示したと報告している⁹⁾。また悪性黒色腫より分離培養された活性化 TIL が、*in vitro* で自己の新鮮分離癌細胞に対して特異的な抗腫瘍活性を示したことも報告されている¹⁰⁾。以上のように TIL には強力な特異的な抗腫瘍活性が想定され、第二の養子免疫療法として期待されている。

今回 TIL の性状を明らかにするために各種癌より TIL を分離し rIL-2 存在下に培養し活性化 TIL を誘導した。培養は 2 種類の培養液にて行ない培養条件による増殖率の差異を検討した。また TIL の細胞傷害活性の時間的推移と phenotype の変動をそれぞれ ⁵¹Cr release assay 法と flow cytometry 法によって検討し、さらにリンパ球キラー細胞の細胞傷害因子と考えられているパーフォリンの発現を酵素抗体法による免疫染色法にて検討した。

材 料 と 方 法

当科で切除された悪性腫瘍または癌性胸膜炎を対象とした。すなわち胃癌肝転移巣 1 例、乳癌術後癌性胸膜炎 1 例、胆嚢癌 1 例を A 群とし、肺癌 1 例、大腸癌肝転移巣 1 例、非切除乳癌癌性胸膜炎 1 例を B 群とした。両群より TIL を分離し異なった培養液にてそれぞれ培養し増殖率の差を検討した。次に B 群の TIL について細胞傷害活性の時間的推移を、そして非切除乳癌癌性胸膜炎症例より分離した TIL についてはリンパ球 phenotype の変動とパーフォリンの発現について検討した。

1. 細胞の分離と培養

手術室にて切除直後の標本より無菌的に癌組織を採取した。生理食塩水 500ml streptomycin 1g, kanamycin 1g を加えた溶液にて洗浄した後、メス及びハサミにて約 1mm 角に細切し collagenase type IV 0.1%, DNase type I 0.002%, hyaluronidase type V 0.01% (Sigma 社) を含

む RPMI-1640(日水製薬)に浮遊させ、スターラーで室温下 4~12時間攪拌する。そして得られた細胞浮遊液を滅菌したスチールメッシュで濾過して遠沈した後、PBS で 2 回洗浄し Ficoll-Conray 溶液による比重遠沈法にて TIL に富む分画と腫瘍細胞に富む分画とに分離した。また癌性胸水は無菌的に採取した後、遠沈し Ficoll-Conray 溶液にて TIL を分離した。トリパンブルー染色法による TIL の viability は全て 95% 以上であった。得られた TIL を complete medium(CM)に浮遊させ 5×10^5 /ml (B群乳癌癌性胸水症例のみ 10×10^5 /ml) とし培養に供した。CM は RPMI-1640 に 25mM Hepes(Sigma 社), 10% ヒト AB serum, 100 u/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine (日水製薬)を加えて使用した。A群はこの細胞浮遊液に rIL-2(シオノギ製薬)を 1000 u/ml の濃度で添加して培養した。B群は rIL-2 1000 u/ml とさらに conditioned medium(CoM) 20% を添加して培養した。CoM は当科における LAK 療法の際に¹¹⁾, 担癌患者より分離した末梢血単核細胞を rIL-2 1000 u/ml とともに 3 日間培養した溶液の上清液である。またこの群は、増殖率が低下したときに phytohemagglutinine P (PHA) (Difco 社)を添加し培養を継続した。培養は 5% CO₂ 下, 37°C で行なった。1 週間毎に培養液を交換し細胞数を算定した後、もとの濃度に調整し再び培養を行なった。培養は増殖不能となるまで続け、増殖率は培養期間中の細胞の全増殖倍数を expansion index (EI) として表示した。

2. 細胞傷害活性の測定

TIL の細胞傷害活性の測定は 4 時間 ⁵¹Cr release assay に行なった。NK(natural killer)活性の標的細胞として K562 (ヒト慢性骨髄性白血病由来株)と LAK 活性の標的細胞として Daudi 細胞(ヒト lymphoma 由来株)を用いた。標的細胞を 100 μ Ci の Na₂⁵¹CrO₄ (New England Nuclear 社)で 37°C, 1 時間標識し PBS にて 3 回洗浄後 RPMI-1640 で 5×10^4 /ml に調整し、さらに 96 穴マイクロプレート (Corning 社)に 100 μ l ずつ分注した。effector/target ratio が 20, 10, 5 の 3 段階になるように TIL 浮遊液を 100 μ l ずつ加え、5% CO₂ 下, 37°C で 4 時間培養した

後、上清を 100 μ l 回収しガンマシンチレーションカウンターにて測定した。測定は全て triplicate で行い % cytotoxicity を以下の式にて算出した。

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{(\text{experimental})_{\text{cpm}} - (\text{spontaneous})_{\text{cpm}}}{(\text{total})_{\text{cpm}} - (\text{spontaneous})_{\text{cpm}}} \times 100$$

spontaneous cpm は標的細胞のみ培養した上清の放射線活性であり、total cpm は標的細胞の全放射線活性である。細胞傷害活性は 1 週間毎に測定した。なお細胞傷害活性は Pross らの式により¹²⁾, 30% lytic unit (LU)/10⁶cell に換算し表示した。1 LU は 5×10^4 個の標的細胞の 30% を溶解するために必要な effector 細胞数として決定され、10⁶ 個の effector 細胞あたりの LU を計算した。

3. リンパ球表面抗原の解析

B群の非切除乳癌癌性胸膜炎症例について TIL の表面抗原の解析を flow cytometry 法で行なった。モノクローナル抗体は抗 OKT3 (CD3), 抗 OKT8 (CD8), 抗 OKT4 (CD4) (以上 Ortho-mune; オルソダイアグノスティクスシステム社), および抗 Leu7 (CD57), 抗 Leu11 (CD16), 抗 Leu15 (CD11), 抗 Leu19 (CD56), 抗 HLA-DR, 抗 IL-2R (CD25) (以上 Beckton-Dickinson 社)を用い single および two colour 解析を行なった。

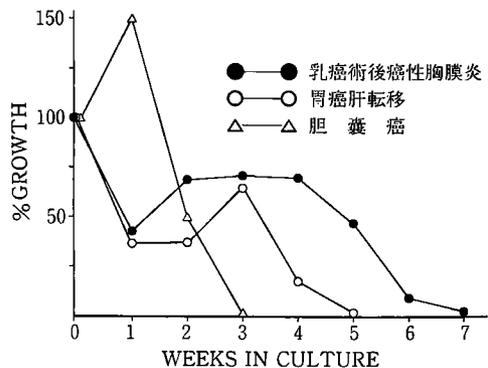


図1 腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)の増殖率(A群) rIL-2 1000 u/ml 単独培養による TIL の増殖率である。3 症例共に 3 w から 7 w で死滅し expansion index (EI) は 1 を越えなかった。

4. 抗パーフォリン抗体による免疫染色

B群の非切除乳癌癌性胸膜炎症例について、TILの抗パーフォリン抗体(順天堂大学, 奥村教授より供与)による免疫染色をABC法にて行なった。 $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した TIL 浮遊液より1プレパラートあたり $100 \mu\text{l}$ を, サイトスピンにてスライドグラス上に遠沈し標本を作成した。冷アセトンに3分間, 4%パラホルムアルデヒ

ドに1分間浸し固定した後, 50mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.6)で洗浄し, 0.5%過ヨウ素酸溶液にて10分間処理した。洗浄の後ウサギ血清(ブロッキング抗体)で処理し, anti-mouse perforin rat monoclonal antibody を室温で1時間反応させた。洗浄後 biotinylated rabbit anti-rat IgG (Vector Laboratories 社)と30分間反応させ洗浄し, さらに avidin-biotinylated peroxidase

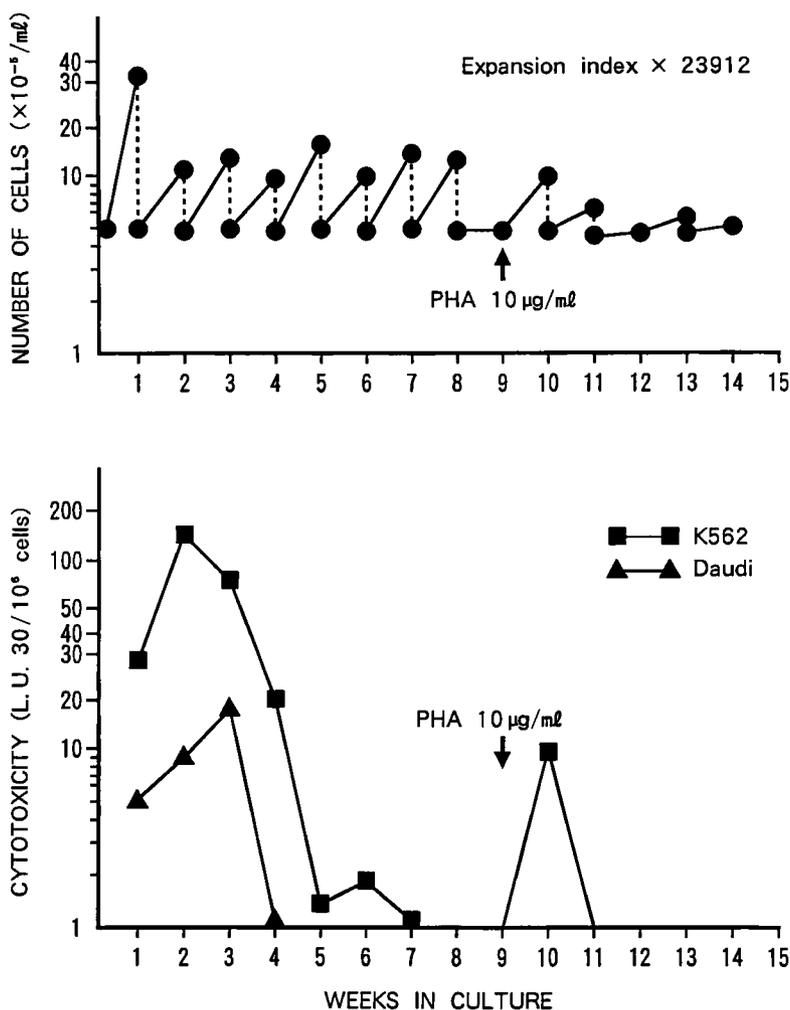


図2 腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)の増殖率と細胞傷害活性(肺癌)

rIL-2 $1000 \text{ u}/\text{ml}$ と conditioned medium (CoM) 20%を添加して培養した肺癌由来 TIL の増殖率(上段)と細胞傷害活性(下段)の時間的推移である。TILは培養開始より良好な増殖を示した。9wで増殖率が低下したため PHA $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ を添加したところ, 再び立ち上がり14wまで増殖し EI も23912に達した。細胞傷害活性は分離直後の TIL は示さなかったが, 1w目より認められた。活性の peak は K562 に対しては 2wで152LU, Daudi に対しては 3wで19LUであった。その後それぞれ 7wと 4wで活性は消失したが, PHA を添加した後に K562 に対してのみ活性を示した。

complex (Vector Laboratories 社) と 1 時間反
 応させた。洗浄後, diaminobenzidine (DAB) に
 て発色させ, 核染色を Meyer-Hematoxilin に
 て行なった。染色は 1 週間毎に行なった。

結 果

1. TIL の増殖率の検討

1) A 群 TIL の増殖率 (図 1)

CM に rIL-2 を 1000 u/ml 添加し培養した。
 胆嚢癌, 乳癌症例ともにほぼ同様の経過をたど
 り, 細胞数は 1 week (w) で約 50%, 3 w で約 75
 % になり 5 および 7 w で死滅した。胃癌肝転移症

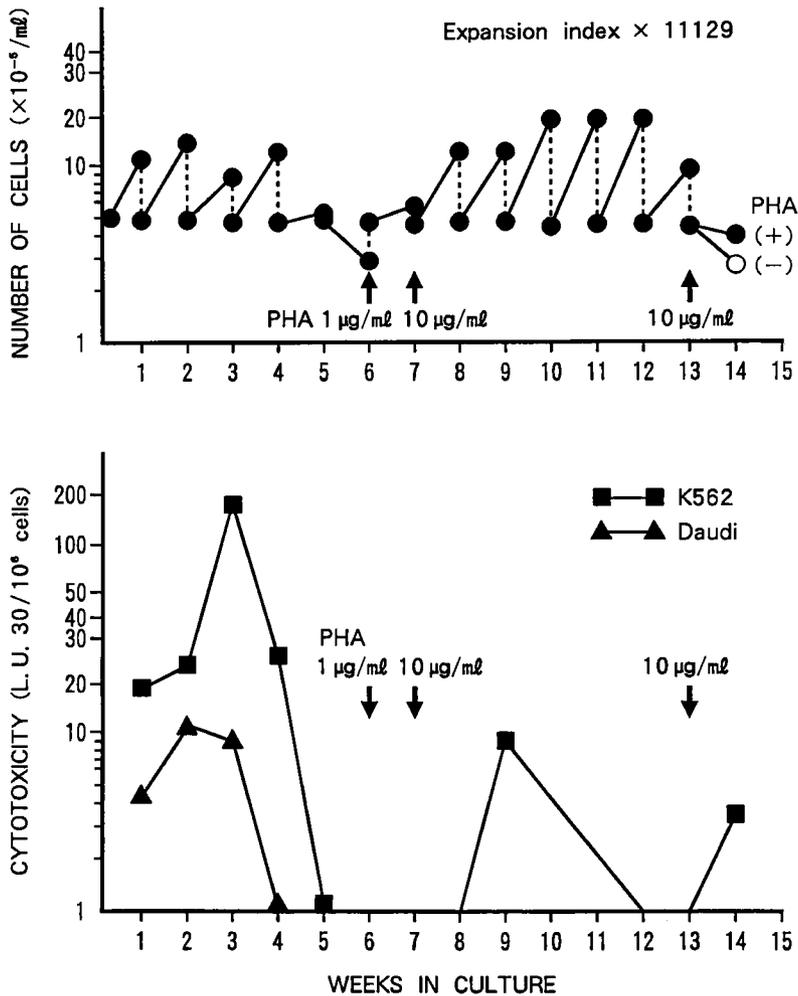


図 3 腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)の増殖率と細胞傷害活性(大腸癌肝転移)
 rIL-2 1000 u/ml と conditioned medium (CoM) 20% を添加して培養した大腸癌肝転移由来 TIL の
 増殖率(上段)と細胞傷害活性(下段)の時間的推移である。TIL は培養開始より良好な増殖を示した。5
 w, 7 w, 13w に PHA を添加したところ 13w まで増殖を続け EI も 11129 に達した。細胞傷害活性は分離
 直後の TIL は示さなかったが, 1w 目より認められた。活性の peak は K562 に対しては 3w で 185 LU,
 Daudi に対しては 2w で 11 LU であった。その後それぞれ 5w と 4w で活性は消失したが, PHA を添加
 した後に K562 に対してのみ活性を示した。

例では1wで約1.5倍, 2wで約0.5倍となり3wで死滅した。以上のようにどの症例も expansion index (EI)は1を越えなかった。

2) B群 TIL の増殖率(図2, 3, 4 上段)

CMに rIL-2 1000 u/ml と CoM を20%添加し培養した。この群の TIL は著明な増殖を示した。肺癌症例では培養開始より著明な増殖を示し1wで6倍, その後も2から3倍の増殖率を維持した。9wで増殖率が落ちたために PHA を

10 μ g/ml 添加したところ再び立ち上がり14wまで培養可能であった。14wまでの EI は23912であった(図2上)。大腸癌肝転移症例では培養開始より2から3倍の増殖率を示した。5wで増殖率が落ちたため PHA を6wで1 μ g/ml, 7wで10 μ g/ml 添加したところ, 3から4倍の増殖率を示した。しかし, 再度増殖率の低下した13wで PHA を添加しても増殖は認められなかった。13wまでの EI は11129であった(図3上)。乳癌症

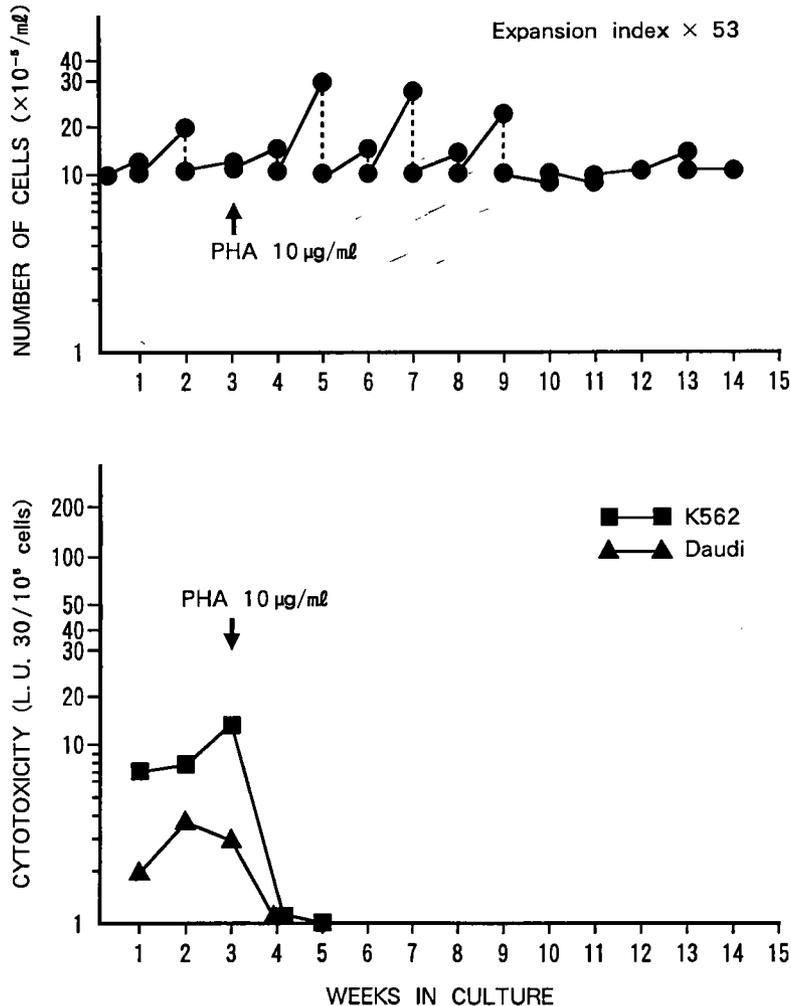


図4 腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)の増殖率と細胞傷害活性(乳癌癌性胸膜炎)

rIL-2 1000 u/ml と conditioned medium (CoM) 20%を添加して培養した乳癌癌性胸水由来 TIL の増殖率(上段)と細胞傷害活性(下段)の時間的推移である。TIL は培養初期の増殖率が低かったために, 3wで PHA を添加したところ14wまで増殖を続けた。EI は53であった。細胞傷害活性は分離直後の TIL は示さなかったが, 1w目より認められた。活性の peak は K562 に対しては3wで13LU, Daudi に対しては2wで3.5LUであった。その後それぞれ5wと4wで活性は消失した。

例では培養初期の増殖率が1.1から2倍と低かったために、3wでPHAを $10\mu\text{g/ml}$ 添加したところ、9wまでは増殖率も立ち上がったがその後は低下し14wで増殖不能となった。14wまでのEIは53であった(図4上)。以上のようにA群よりもB群のほうがはるかに増殖率が高くEIも53から23912が得られた。

2. TILの細胞傷害活性の検討(図2, 3, 4下段)

B群のTILについて細胞傷害活性の時間的推移を4時間 ^{51}Cr release assayを用いて検討した。全ての症例でTIL分離直後の細胞傷害活性は認められず、培養1日目より活性が認められ始めた。肺癌症例では活性のpeakがK562に対しては2wで152LU, Daudiに対しては3wで19LUでありそれぞれ7wと4wで活性は消失した。その後PHAを加えた1w後の10wにK562に対する活性のみ示し10LUであった(図2下)。大腸癌肝転移症例では活性のpeakがK562に対しては3wで185LU, Daudiに対しては2wで11LUでありそれぞれ5wと4wで活性は消失した。そしてPHAを加えた後の8wと13wにK562に対する活性のみ示しそれぞれ10LUと4LUであった(図3下)。乳癌症例では活性の

peakはK562に対しては3wで13LU, Daudiに対しては2wで3.5LUでありそれぞれ5wと4wで活性は消失した(図4下)。つまりTILの細胞傷害活性は2~3wにかけてpeakとなり4~7wで消失した。そしてPHAの刺激によりTILはK562に対してのみ再び細胞傷害活性を示した。

3. リンパ球表面抗原の解析

B群の乳癌症例について、1週間毎にflow cytometry法によりリンパ球表面抗原の解析を行なった。

1) CD3, CD4, CD8(図5)

分離直後のTILは CD3^+ T細胞が主体であり(91.9%),培養期間を通して漸増し14wには98.9%に達した。そして CD4/CD8 細胞比は、培養開始時はそれぞれ75.4%, 13.9%と CD4 細胞優位であったが、培養するに従い CD4 は漸減し CD8 細胞は漸増した。その後7wで逆転し14wでは CD4 細胞25.5%, CD8 細胞68.1%と CD8 細胞優位となった。

2) $\text{CD8}^+\text{CD11}^-$, $\text{CD8}^+\text{CD11}^+$ (図6)

いわゆるcytotoxic T cellである $\text{CD8}^+\text{CD11}^-$ とsuppressor T cellである $\text{CD8}^+\text{CD11}^+$ につ

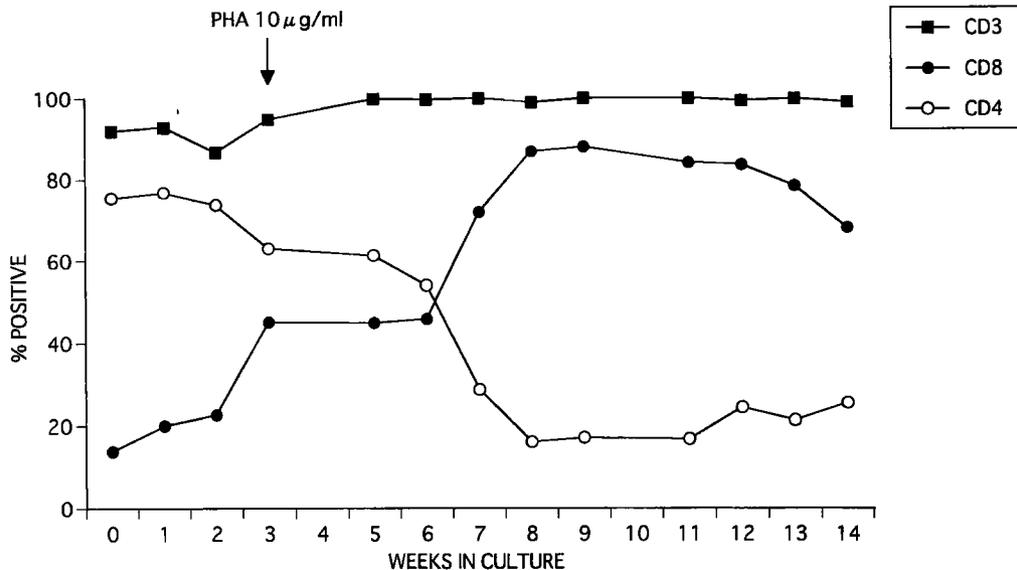


図5 CD3^+ , CD8^+ , CD4^+ 細胞の経時的変化

分離直後のTILは CD4 優位の CD3^+ T細胞主体であったが、培養の経過とともに7wで逆転しその後は CD8 優位となった。

いてみた。CD8⁺CD11⁻は分離直後12.1%であったが培養とともに増加し9wで peak の87.3%となり、その後漸減し14wで66.7%となった。CD8⁺CD11⁺は分離直後1.8%であり漸増し8wで peak に達し16.3%となったが、9w以降ほとんど認められなくなった。

3) HLA-DR(図7)

活性化の指標である DR⁺細胞について経過をみた。分離直後 TIL の DR⁺細胞は21.5%であり、TIL 内に活性化された細胞群が存在することが認められた。その後1wで40.8%となったが3wで21.3%と減少した。3wで培養液に PHA を10 μ g/ml 加えた後は漸増し7wで peak の78.1%に達した。それ以降漸減し14wで10.4%となった。

4) CD3⁺DR⁺, CD8⁺DR⁺, CD4⁺DR⁺(図8)

活性化細胞の指標である DR⁺細胞を CD3, CD8 と CD4 についてみた。分離直後の DR⁺細胞21.5%のうち CD3⁺は17.7%であり、活性化細胞の82.3%は CD3⁺T細胞であった。CD3⁺DR⁺は1wで36.5%となりその後漸減し3wで18.0%となった。3wで培養液に PHA を10 μ g/ml 加えた後は漸増し7wで peak の78.0%に達した。それ以降漸減し14wで10.4%となった。つまり培養経過中 DR⁺細胞はほとんど CD3⁺とな

った。

次に分離直後の CD8⁺DR⁺細胞は7.2%、CD4⁺DR⁺細胞は8.3%でありそれぞれ漸増し peak は7wの51.6%、5wの33.1%であった。その後は漸減し14wにはそれぞれ1.1%、3.0%となった。

5) Leu7(CD57), Leu11(CD16), Leu19(CD56)(図9)

NK細胞のマーカーである Leu7, Leu11, Leu19 についてみると分離直後はそれぞれ4.9%、3.2%、6.7%であった。Leu7, Leu11 は培養期間を通して増加せず横ばいで経過した。Leu19 は6w以降急増し始め9wで peak の74.8%となり、その後は漸減し14wで60.1%となった。

6) Leu11⁻Leu19⁺, Leu11⁺Leu19⁺(図10)

Leu11⁻Leu19⁺, Leu11⁺Leu19⁺は分離直後はそれぞれ5.6%、1.1%であった。Leu11⁻Leu19⁺は6wまで横ばいで増加せず、その後急増し9wで peak の71.9%となり14wで58.8%となった。Leu11⁺Leu19⁺は増加せず横ばいで14wまで経過した。

7) IL2-R(図11)

IL-2 のレセプターについてみると、分離直後は1.2%であり培養に伴い増加し2wで17.1%、3wで8.9%となった。3wで PHA を加えてからは82.0%と急増しその後漸減し14wで3.3%と

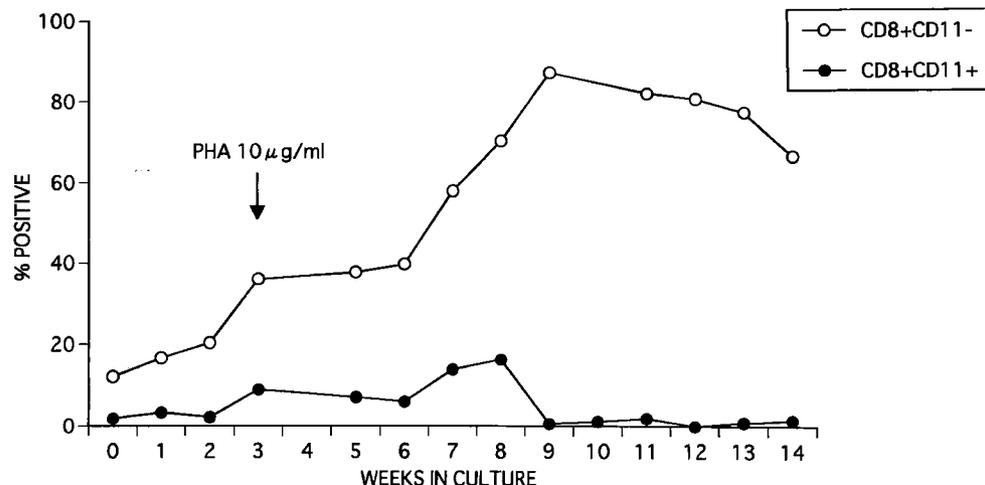


図6 CD8⁺CD11⁻, CD8⁺CD11⁺細胞の経時的変化

分離直後の CD8⁺CD11⁻細胞は12.1%であったが培養とともに漸増し9wで peak に達し、その後漸減した。CD8⁺CD11⁺は分離直後1.8%と非常に少なく、培養中もほぼ横ばいの経過を示した。

なった。

4. 抗パーフォリン抗体による免疫染色(図12)

B群の乳癌症例について、分離培養したTILを1w毎にサイトスピンを用いてプレパラートを作成した後、抗パーフォリン抗体にて免疫染色を行なった。検鏡は200倍で行なった。分離直後

のTILではパーフォリンはほとんど染色されなかった。その後培養の経過とともにパーフォリン陽性細胞の比率の増加と、個々の細胞の染色されるパーフォリンの量の増加が認められ3wでpeakに達した。これは細胞傷害活性のpeakが3wであったことと相関する(図4下)。その後

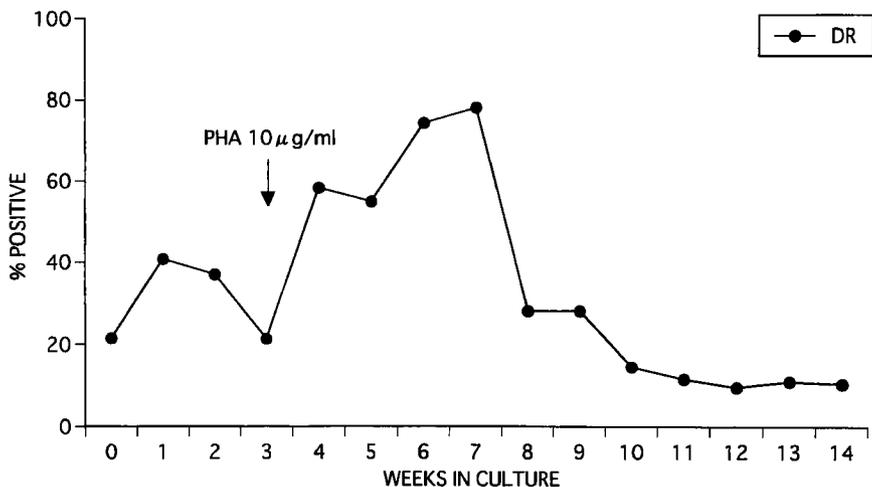


図7 DR⁺細胞の経時的変化

活性化の指標であるDR⁺細胞はTIL分離直後21.5%認められた。PHA添加後漸増し7wでpeakに達した後漸減した。

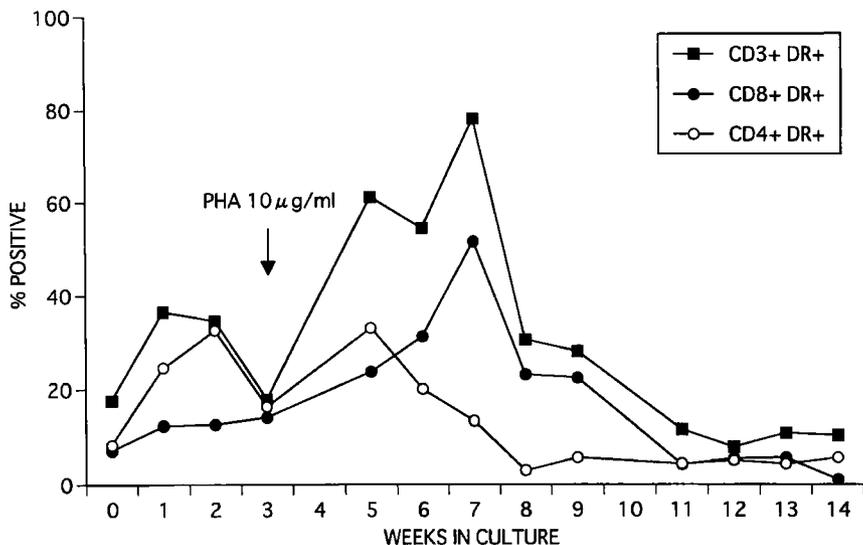


図8 CD3⁺DR⁺、CD8⁺DR⁺、CD4⁺DR⁺細胞の経時的変化

DR⁺細胞をCD3、CD8とCD4についてみた。分離直後のDR⁺細胞の比率はCD8、CD4共にほぼ同じであった。培養とともにCD8は漸増し、7wでpeakに達して漸減したが、CD4は二相性の増加を示しそのpeakは3wと5wにあった。

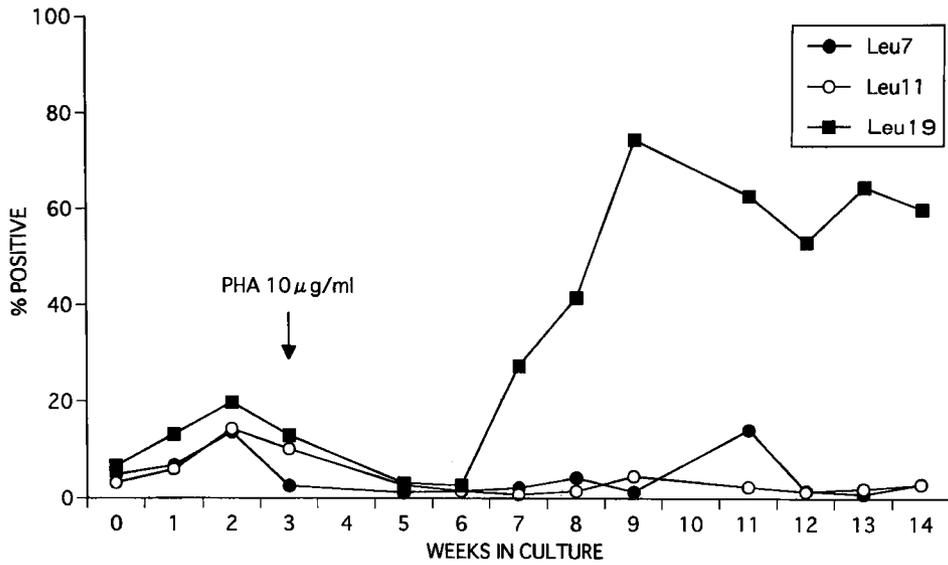


図9 Leu7⁺, Leu11⁺, Leu19⁺細胞の経時的変化
NK細胞のマーカーであるLeu7, Leu11, Leu19についてみた。Leu7, Leu11は培養期間を通して増加せずほぼ横ばいを示した。Leu19は二相性の増加を示した。2wにまず最初のpeakに達し、その後6wより急増し9wで再びpeakに達した後漸減した。

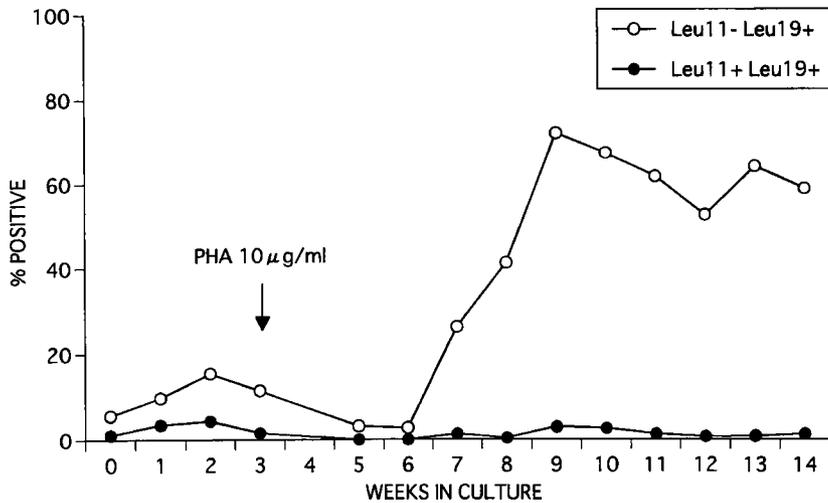


図10 Leu11-Leu19⁺, Leu11⁺Leu19⁺細胞の経時的変化
Leu11-Leu19⁺は二相性の増加を示し、そのpeakは2wと9wであった。Leu11⁺Leu19⁺は培養期間を通して全く増加しなかった。

徐々にパーフォリン陽性細胞の減少と、個々の細胞のパーフォリン量の減少が認められ、10wにはパーフォリンは染色されなくなった。図12にはそれぞれ分離直後、2w, 3w, 7w, 10wの免疫染色を示す。

考 察

従来より、腫瘍の間質に浸潤しているリンパ球の程度と予後には相関があることが知られており、腫瘍に対する宿主の免疫学的応答と考え

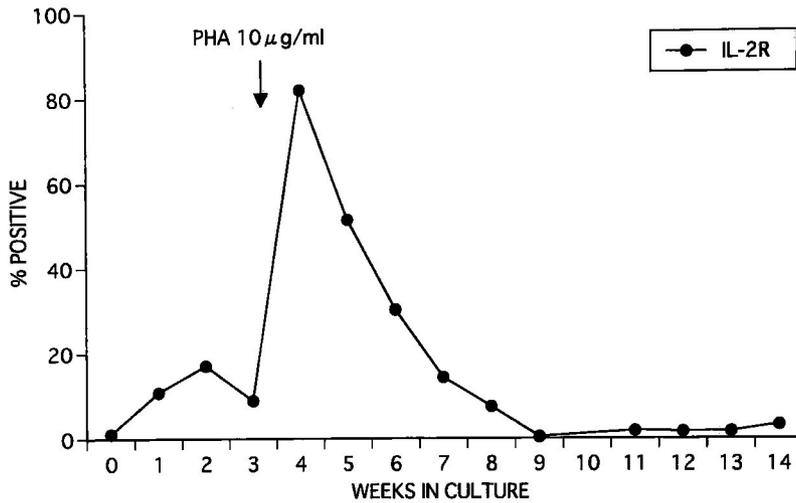


図11 IL-2R⁺細胞の経時的变化

IL-2R は分離直後ほとんど認められなかったが、培養とともに2wまで漸増した。3wでPHAを添加したところ急増し4wでpeakの82.0%に達し、その後急減し9wでほとんど認められなくなった。

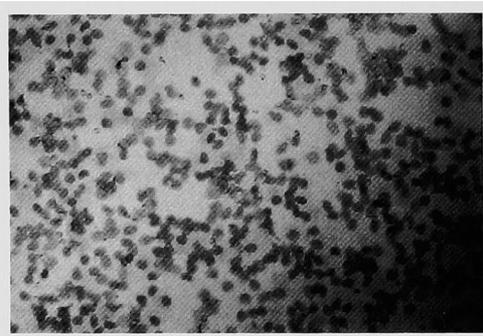


図12(a) 分離直後抗パーフォリン抗体によるTILの免疫染色(×100)
分離直後のTILではパーフォリンはほとんど染色されていない。

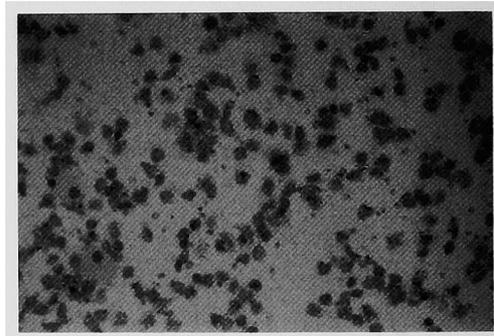


図12(b) 培養2w後抗パーフォリン抗体によるTILの免疫染色(×100)
パーフォリン陽性細胞の出現が認められる。

られてきた^{7,8)}。これら腫瘍内浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocytes; TIL)を分離し、rIL-2で培養活性化した後に体内に戻して抗腫瘍活性を期待するTIL療法の基礎的、臨床的研究が盛んに行なわれている。これは末梢血単核細胞由来のLAK細胞と違い、TILが免疫学的応答を示している選ばれた細胞集団であり、方法によっては優れた抗腫瘍活性を期待できるのではないかと考えられているからである。すでにRosenbergらは腫瘍組織より分離しrIL-2と共に培養したTILがLAK細胞の50~100

倍の抗腫瘍活性を示したとし⁹⁾、Itohらは悪性黒色腫において、新鮮分離癌細胞に対する特異的な抗腫瘍活性を認めたと報告している¹⁰⁾。そしてこれらTILの基礎的研究が進むにつれて、臨床応用つまり活性化TILの体内移入療法の報告も散見されるようになった¹³⁻¹⁵⁾。

今回TILの性状を明らかにするために、各種癌よりTILを分離しrIL-2存在下に培養した。そして培養条件、増殖率、細胞傷害活性、リンパ球表面マーカー、パーフォリンについて検討した。

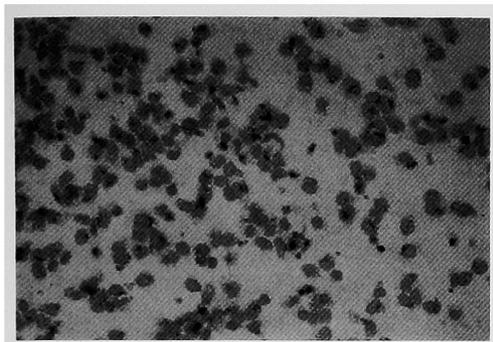


図12(c) 培養3w後抗パーフォリン抗体によるTILの免疫染色(×100)
パーフォリン陽性細胞の比率の増加と、個々の細胞の染色されるパーフォリンの量の増加が peak に達する。

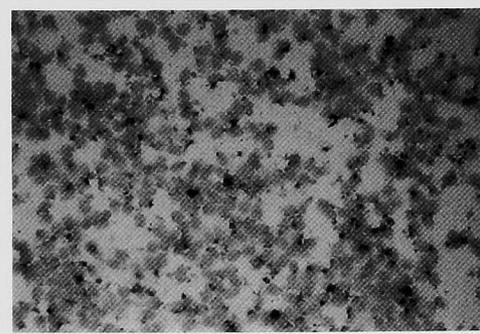


図12(d) 培養7w後抗パーフォリン抗体によるTILの免疫染色(×100)
パーフォリン陽性細胞の比率の減少と、個々の細胞の染色されるパーフォリンの量の減少が認められる。

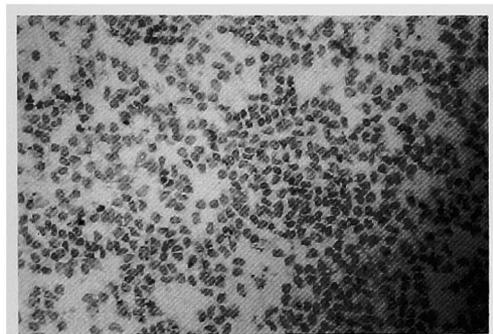


図12(e) 培養10w後抗パーフォリン抗体によるTILの免疫染色(×100)
パーフォリン陽性細胞は認められなくなった。

はじめに TIL の培養に関して、rIL-2 1000 u/ml 単独 (A 群) と rIL-2 1000 u/ml に LAK 細胞培養液の上清である CoM を 20% 添加したもの (B 群) との増殖率を比較した。A 群ではすべて 7w 以内に TIL は死滅し EI も 1 を越えなかったが、B 群では良好な増殖を示し 14w まで増殖し EI も 53 から 23912 が得られた。そして培養初期においても良好な立ち上がりを示した。このように CoM を添加した培養液の方が高い増殖率が得られた理由は、CoM に含まれている IL-2 以外の cytokine の関与が考えられる。実際 IL-2 と IL-4 を併用した TIL の培養において、IL-2 単独の場合と比べて移入細胞数が 6.5 倍に増加したとの報告があり¹⁶⁾、その他 interferon (IFN)

の関与も考えられる。分離直後の TIL は反応性が低下しており、Miescher らは限界希釈法にて TIL の single cell レベルでの PHA に対する反応性を調べた結果、末梢血単核球と比べて 1/10 から 1/100 の増殖性しか示さなかったとしている。またしばしば IL-2 に対しても増殖を示さなかったとし、この低反応性は腫瘍の産生する抑制物質による可能性を示唆している¹⁷⁾。

今回の実験より反応性の低下した TIL は、IL-2 を含めた各種の cytokine による刺激によって、IL-2 単独の場合よりもより高い増殖性を示したと考えられる。しかし Beldegrun らは 35 例の腎癌の患者より分離した TIL のうち最初の 5 例を、正常なドナーの末梢血単核球を rIL-2 1000 u/ml で 3 日間培養して得られた溶液を 20% 添加した溶液で培養したが、rIL-2 単独の場合と差はなかったとしている。そしてこの実験で TIL は、全く増殖を示さなかったものから 500000 倍以上の増殖率を示したものまで様々であったと報告している¹⁸⁾。このような TIL の増殖率の幅は、腫瘍の種類や、腫瘍からの抑制因子、そして TIL のもとの量や性質、培養液の種類などに依っていると考えられる。

今回 CoM を添加して培養した群において、増殖率が低下した時期に PHA を添加したところ増殖率の再上昇をみた。分離直後の TIL は PHA に対する反応性が低下しているが、一度増殖を始めた後は PHA に反応するため、増殖率

が低下したときに PHA を添加し高い増殖率を得るのは有効な方法であると思われる。Schoof らは TIL が、高濃度の rIL-2 で培養経過中に rIL-2 に対して反応しなくなる理由として、IL-2 に対する高親和性レセプターである p55 chain (CD25) の表出の低下を指摘し、固相化抗 CD3 抗体による刺激を行ない CD25 の表出を促した結果、増殖も抗腫瘍活性も再活性化されたと報告している¹⁹⁾。また TIL を rIL-2 と抗 CD3 抗体とで培養すると、抗 CD3 抗体の刺激により T 細胞表面の IL-2R の発現が増強され、rIL-2 単独培養の時と比べて増殖率が約16倍増加したとの報告もある²⁰⁾。今回 B 群の乳癌症例において、3 w に抗 CD3 抗体ではなく PHA を 10 μ g/ml 添加したところ、CD25 陽性細胞が 8.9% から 4 w には 82.0% に増加し、その後増殖率が上昇したのも同様の機序と考えられる (図 11, 4 上段)。

以上のように TIL を培養する場合に rIL-2 単独のみならず、IL-4 などの cytokine、そして抗 CD3 抗体や PHA などと共に培養した方が高い増殖率を期待できると思われる。しかし rIL-2 単独培養とは異なった cell population の増殖を促進する可能性はあるが、それが抗腫瘍活性をもった集団であれば許容できるものと考えられる。またそうでなくても生体内では TIL の抗腫瘍活性能よりも、増殖能や lymphokine の産生能の方が重要との意見もある¹⁹⁾。

TIL の細胞傷害活性を K562 と Daudi で調べた。分離直後の TIL は全ての症例で細胞傷害活性は認められず、培養 1 w より活性が認められ始めた。そして活性は 2 w から 3 w にかけて peak に達し、4 w から 7 w にかけて消失した。それ以降は全く活性を認めず、PHA の刺激により K562 に対してのみ再び活性を示した (図 2, 3 下段)。以上の事より TIL の養子免疫療法 (adoptive immunotherapy) においては、分離した TIL を効率よく培養し、より多くの細胞を 2 w から 3 w の間に生体内に移入することが大切であると思われる。そして必要な細胞数が得られない場合や、細胞傷害活性が低い場合には PHA や抗 CD3 抗体で刺激して培養する方法が有効であると考えられる。今回検討した細胞傷害活性は NK 活性 (K562) と LAK 活性 (Daudi) であり、非特異

的な抗腫瘍活性であるが、あらゆる研究者の関心事は自己腫瘍組織から分離した TIL から自己腫瘍に特異的な抗腫瘍活性を示す cytotoxic T lymphocyte (CTL) を誘導できるかどうかであろう。人の悪性腫瘍では悪性黒色腫由来の TIL から CTL が得られたとの報告が多い^{10,21,22)}。Itoh らは悪性黒色腫由来の TIL を rIL-2 1000 u/ml で培養し細胞傷害活性を解析した結果、自己の癌細胞に対して強い選択性を示す effector 細胞が得られたとしている。そしてこの細胞の phenotype は CD3⁺CD8⁺CD4⁻ であり、この活性は TCR $\alpha\beta$ ヘテロダイマーに対する抗体と HLA-ABC 抗原に対する抗体によって抑制されるため、T 細胞の $\alpha\beta$ レセプターを介した MHC class I 拘束性の細胞傷害活性を示す CTL である可能性を示唆している²¹⁾。Muul らは 6 例の転移性悪性黒色腫の患者より得られた活性化 TIL のうち 3 例に TIL に自己癌に特異的な細胞傷害活性を認め、これらの細胞はすべて CD4⁺ T 細胞であったとしている²²⁾。このように悪性黒色腫から CTL が誘導される理由として Itoh ら²¹⁾ は免疫原性の高さを推測しているが、一般的にその他の腫瘍では CTL はほとんど誘導されていない。Belldegrun¹⁸⁾ は 35 例の腎癌患者より、また石井ら²²⁾ は腎癌、消化器癌などの各種固形癌 46 例より得られた TIL について細胞傷害活性を調べたが、すべて非特異的活性であったと報告している。TIL は heterogeneous な細胞集団であり、高濃度の rIL-2 で培養するとあらゆる細胞が活性化されるため、Balch らは低濃度の rIL-2 で培養を試みたが必ずしも CTL を誘導できなかった²⁴⁾。

heterogeneous な細胞集団である TIL のなかには自己癌細胞に特異的な細胞傷害活性を示す CTL や、非特異的な活性を示す細胞が存在すると考えられ、それらを個別に誘導する方法の研究が今後の課題であると考えられる。

乳癌癌性胸膜炎の症例について、TIL の phenotype の時間的推移を検討した。分離直後の TIL はほとんど CD3⁺ T 細胞で、CD4 細胞が CD8 細胞の約 6 倍あり CD4 細胞優位であった。IL-2R (CD25) はほとんど発現されていないが (1.2%)、DR⁺ 細胞が 21.5% であり、ある程度

活性化されており、その82.3%までがCD3であった。次に cytotoxic T cell とされる CD3⁺CD11⁻と suppressor T cell とされる CD3⁺CD11⁺は、それぞれ12.1%と1.8%であった。そしてNK細胞のマーカーである Leu7, Leu11, Leu19はそれぞれ4.9%, 3.2%, 6.7%であった。その後培養の経過とともに、CD3は漸増しプラトーに達し、CD4は減少しCD8は増加し7wで逆転した。その後はCD8細胞優位になり、14wにはCD8細胞がCD4細胞の約3倍となった。IL-2Rは培養とともに漸増したが3wで8.9%になり、PHAを添加した後は4wで82.0%の発現率を示し、その後急減し14wにはほとんど発現されなくなった(3.3%)。DRも培養とともに漸増したが3wで21.3%となり、PHAを添加した後は7wまで漸増し78.1%に達した後に漸減し14wには10.4%となった。つまりPHAを添加した後の変化は、IL-2Rは発現率が急激に上昇し、その後急激に低下したが、DRは緩徐に上昇し緩徐に低下した。そしてIL-2RとDRの発現率の上昇している時期と、増殖率の上昇している時期はほぼ一致していた。次にLeu7, Leu11, Leu19は2wでそれぞれ13.7%, 14.3%, 19.8%と最初のpeakに達したが5wですべて3%以下になり、Leu19のみ6w以降立ち上がり9wで74.8%のpeakに達し14wで60.1%になった。

分離直後のTILのphenotypeはCD3⁺T細胞主体であることは自験例を含め諸家の報告と一致する^{10,18,19,21-23,25-28}。しかしCD3⁺T細胞のsubsetについてはCD8優位とする報告^{10,19,25-27}や、CD4優位とする報告^{18,22}がある。次に長期培養時のTILのsubsetはCD8優位^{10,19,26,27}、またはCD4優位^{18,22}であるとする報告や、症例または腫瘍によって一定していないとの報告がある^{21,23,24,28}。つまりTILのT細胞subsetは、生体内での腫瘍に対する免疫応答性や培養条件によって影響を受けているものと考えられる。

TILの抗腫瘍活性を担当する細胞のphenotypeについて、CTLが誘導されたとされる悪性黒色腫の系で、ItohらはCD8⁺T細胞²¹と、MuulらはCD4⁺T細胞²²であったと報告している。次に非特異的な抗腫瘍活性を示した系において、Heoらは16例のsquamous cell carcinoma

(SCC)と4例のnon-SCC由来のTILより、最も高い増殖率を示す細胞群はCD3⁺Leu19⁻であるが抗腫瘍活性はほとんど示さず、sortingによる解析ではCD3⁻Leu19⁺ and/or CD3⁺Leu19⁺が抗腫瘍活性を示し形態学的にはlarge granular lymphocytes (LGL)であったと報告している²⁹。またTakagiらは原発性肝癌由来のTILにおいて、抗腫瘍活性を示したのはCD3抗原に関係なくLeu19抗原陽性細胞であったとしている。そして培養におけるCD3⁺Leu19⁺細胞群の頻度は二相性で最初のpeakは30から60日の間にあり、これは抗腫瘍活性の増強した時期と一致し、二度目のpeakは60日以降にあり、これは抗腫瘍活性とは関係なかったと報告している³⁰。この所見は自験例と一致している。

Balchらは120例の悪性腫瘍由来のTILについて分析した結果、3種類のeffector細胞を確認している。つまり悪性黒色腫由来のeffector細胞はCD3⁺CD16⁻(Leu11⁻)でMHC拘束性の抗腫瘍活性を示し、腎癌由来のそれはCD3⁻CD16⁺のNK細胞でMHC非拘束性の高い抗腫瘍活性を示した。そして悪性黒色腫以外の癌由来のそれはCD3⁺CD16⁻でMHC非拘束性の中等度の抗腫瘍活性を示したと報告している²⁴。

今回の長期培養において最も多くなったsubsetはCD3⁺Leu11⁻Leu19⁺であり、これはLanierら³¹の云う標的細胞を認識しNK感受性のLGLであるが、この時期には細胞傷害活性を示さなかった。

キラー細胞の細胞傷害因子としてパーフォリン、lymphotoxin, tumor necrosis factor (TNF)等が知られているが^{32,33}、今回の実験ではパーフォリンに着目し、培養TILを経時的に免疫染色した。パーフォリンはNK細胞や細胞傷害性T細胞の細胞質顆粒内に存在し、キラー細胞が標的細胞に結合した際に脱顆粒が起り、放出されたパーフォリンが標的細胞の膜表面にドーナツ状の穴を形成し、細胞を傷害すると考えられている^{34,35}。奥村らにより抗マウスパーフォリン抗体が作成され、これがヒトパーフォリンと交差反応するため³⁶、免疫染色が可能となった。今回酵素抗体法を用いて培養TILに免疫染色を行なった。分離直後のTILではパーフォリ

ンはほとんど染色されなかった。その後培養の経過とともにパーフォリン陽性細胞の比率の増加と、個々の細胞の染色されるパーフォリンの量の増加が認められ3wで peak に達した。これは細胞傷害活性の peak が3wであったことと相関する。その後徐々にパーフォリン陽性細胞の減少と、個々の細胞のパーフォリン量の減少が認められ、10wにはパーフォリンは染色されなくなった。この時期には細胞傷害活性は認められず、培養の経過を通して染色されるパーフォリンの量と細胞傷害活性はほぼ相関していた。つまり TIL の細胞傷害機序にパーフォリンが関与している可能性が示唆された。

結 論

各種癌の TIL を rIL-2 にて培養した。培養液に CoM を20%添加することによって高い増殖率を得ることができた。また増殖率が低下した時に、PHA を添加することによって増殖率を維持することができた。細胞傷害活性は2wから3wにかけて peak に達し、4wから7wにかけて消失した。TIL の phenotype はほとんどが CD3⁺T細胞で、分離直後は CD4 優位であった

が、培養とともに CD8 優位となった。また IL-2R と DR の陽性率と増殖率の高い時期はほぼ一致していた。そして TIL の細胞傷害機序にパーフォリンが関与している可能性が示唆された。

TIL の養子免疫療法においては、rIL-2 のみならず CoM や PHA にて高い増殖率を得て、2wから3wの時期に生体内に移入するのが望ましい。TIL は rIL-2 で培養すると広範囲の非特異的な細胞傷害活性を獲得するようになるが、その中には MHC 拘束性の特異的な細胞傷害活性を示す effector 細胞が存在する可能性があり、その点で期待できる療法であるが、今後さらなる研究が必要であると考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました折田薫三教授に深甚なる謝意を捧げます。また直接御指導いただきました田中紀章博士、日伝晶夫博士、猶本良夫博士、ならびに第一外科学教室の各位に心から謝意を表します。また抗パーフォリン抗体を供与していただいた奥村康順天堂大学教授に心より謝意を表します。

なお、本論文の一部は、第49回日本癌学会総会および第91回日本外科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Grimm EA, Ramsey KM, Mazunder A, Wilson DJ, Djeu JY and Rosenberg SA : Lymphokine-activated killer cell phenomenon. II. Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes and natural killer cells. *J Exp Med* (1983) **157**, 884—897.
- 2) Rosenberg SA : Lymphokine activated killer cells; a new approach to the immunotherapy of cancer. *J Natl Cancer Inst* (1985) **75**, 595—603.
- 3) Lafreniere R and Rosenberg SA : Successful immunotherapy of murine experimental hepatic metastases with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2. *Cancer Res* (1985) **45**, 3735—3741.
- 4) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT, Seipp CA, Simpson C and Reichert CM : Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* (1985) **313**, 1485—1492.
- 5) 橋川桂三 : CTL 療法の基礎と臨床. *Biotherapy* (1989) **3**, 629—637.
- 6) 石川 喙, 猪川 勉, 江浦正郎, 吹上忠祐, 村上公輝, 市野幸則, 前原龍彦 : キラー細胞の臨床応用と問題点. *Biotherapy* (1989) **3**, 647—654.
- 7) Inokuchi K, Inutsuka S, Furusawa M, Soejima K and Ikeda T : Stromal reaction around tumor and metastasis and prognosis after curative gastrectomy for carcinoma of the stomach. *Cancer* (1967)

- 20, 1924—1929.
- 8) 石井良文：腫瘍患者におけるリンパ球動態——癌巣内リンパ球を中心に——, 臨床免疫 (1988) **20**, 645—648.
 - 9) Rosenberg SA, Spiess P and Lafreniere R : A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* (1986) **233**, 1318—1321.
 - 10) Itoh K, Tilden AB and Balch CM : Interleukin-2 activation of cytotoxic T-lymphocytes infiltrating into human metastatic melanoma. *Cancer Res* (1986) **46**, 3011—3017.
 - 11) 折田薫三, 日伝晶夫 : LAK 細胞による癌の免疫療法, *Immuno-Advance* (1988) **17**, 14—21.
 - 12) Pross HF, Baines MT, Rubin P, Shragge P and Patterson MS : Spontaneous human lymphocyte mediated cytotoxicity against tumor target cells. IX. The quantitation of natural killer cell activity. *J Clin Immunol* (1981) **1**, 51—63.
 - 13) Topalian SL, Solomon D, Avis FP, Chang AE, Freerksen DL, Linehan WM, Lotze MT, Robertson CN, Claudia AS, Simon P, Simpson CG and Rosenberg SA : Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant Interleukin-2. A pilot study. *J Clin Oncol* (1988) **6**, 839—853.
 - 14) 山上裕機, 谷村 弘, 角田卓也, 岩橋 誠, 谷 眞至, 井上正也, 玉井美紀子 : 腫瘍浸潤リンパ球から誘導した細胞傷害性T細胞による養子免疫療法の臨床応用. *J Jpn Soc Cancer Ther* (1990) **25**, 978—989.
 - 15) 斎藤俊弘, 照沼正博, 古泉孝子, 西山 勉, 郷 秀人, 富田善彦 : 腎癌癌性胸膜炎に局所養子免疫療法が奏効した1例. *日泌尿会誌* (1992) **83**, 1717—1720.
 - 16) 山上裕機, 谷村 弘, 角田卓也, 野口浩平, 岩橋 誠, 谷 眞至, 玉井美紀子, 堀田 司, 溝端静馬, 有井一雄, 岩倉伸次 : 腫瘍浸潤リンパ球を用いた養子免疫療法の臨床効果. *日癌治* (1992) **27**, 1260.
 - 17) Miescher S, Whiteside TL, Carrel S and Von Fliedner V : Functional properties of tumor-infiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumors; Effects of tumor cells and their supernatants on proliferative responses of lymphocytes. *J Immunol* (1986) **136**, 1899—1907.
 - 18) Beldegrun A, Muul LM and Rosenberg SA : Interleukin 2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer; Isolation, characterization and antitumor activity. *Cancer Res* (1988) **48**, 206—214.
 - 19) Schoof DD, Selleck CM, Massaro AF, Jung SE and Eberlein TJ : Activation of human tumor-infiltrating lymphocytes by monoclonal antibodies directed to the CD3 complex. *Cancer Res* (1990) **50**, 1138—1143.
 - 20) 森 良之 : 口腔悪性腫瘍組織浸潤リンパ球からの抗腫瘍活性の誘導に関する研究. *日口外誌* (1992) **38**, 1257—1273.
 - 21) Itoh K, Platsoucas CD and Balch CM : Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. *J Exp Med* (1988) **168**, 1419—1441.
 - 22) Muul LM, Spiess PJ, Director EP and Rosenberg SA : Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. *J Immunol* (1987) **138**, 989—995.
 - 23) 石井誠一, 椎葉健一, 蝦名宣男, 松野正紀 : 各種固形癌由来腫瘍浸潤リンパ球の rIL-2 による活性化と抗腫瘍活性担当細胞の解析. *日外会誌* (1993) **94**, 213—224.
 - 24) Balch CM, Riley LB, Bae YJ, Salmeron MA, Platsoucas CD, Von Eschenbach A and Itoh K : Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. *Arch Surg* (1990) **125**, 200—205.
 - 25) Vose BM : Quantitation of proliferative and cytotoxic precursor cells directed against human tumours; Limiting dilution analysis in peripheral blood and at the tumour site. *Int J Cancer* (1982)

- 30, 135—142.
- 26) Suzuki K, Takayama T, Sekine T, Fujii M and Tanaka T : Growth and cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes; A case report. *Nihon Univ J Med* (1992) **34**, 87—94.
- 27) Rabinowich H, Cohen R, Bruderman I, Steiner Z and Klajman A : Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors; Lysis of autologous human tumor cells by cultured infiltrating lymphocytes. *Cancer Res* (1987) **47**, 173—177.
- 28) Topalian SL, Muul LM, Solomon D and Rosenberg SA : Expansion of human tumor infiltrating lymphocytes for use in immunotherapy trials. *J Immunol Methods* (1987) **102**, 127—141.
- 29) Heo DS, Whiteside TL, Johnson JT, Chen K, Barnes EL and Herberman RB : Longterm interleukin 2-dependent growth and cytotoxic activity of tumor-infiltrating lymphocytes from human squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* (1987) **47**, 6353—6362.
- 30) Takagi S, Chen K, Schwarz R, Iwatsuki S, Herberman RB and Whiteside TL : Functional and phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes isolated from human primary and metastatic liver tumors and cultured in recombinant interleukin-2. *Cancer* (1989) **63**, 102—111.
- 31) Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR and Phillips JH : The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (Nkh-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* (1986) **136**, 4480—4486.
- 32) 熊谷勝男 : 癌の免疫を支配する宿主因子——サイトカイン. *癌と免疫* (1987), 24—31.
- 33) 丸山稔之, 樋口昌宏, 今井康之 : 抗腫瘍作用にかかわるサイトカイン. *Annual Review 免疫* (1989), 165—174.
- 34) Lichtenheld MG, Olsen KJ, Lu P, Lowrey DM, Hameed A, Hengartner H and Podack ER : Structure and function of human perforin. *Nature* (1988) **335**, 448—451.
- 35) Young JD-E, Cohn ZA, Podack ER : The ninth component of complement and the pore-forming protein (Perforin 1) from cytotoxic T cell; Structural, Immunological and functional similarities. *Science* (1986) **233**, 184—190.
- 36) Kawasaki A, Shinkai Y, Kuwana Y, Furuya A, Iigo Y, Hanai N, Itoh S, Yagita H and Okumura K : Perforin, a pore-forming protein detectable by monoclonal antibodies, is a functional marker for killer cells. *International Immunology* (1990) **2**, 677—684.

**The expansion and antitumoral activity of recombinant IL-2
activated tumor infiltrating lymphocytes from human cancers**

Mitsuaki MATSUMOTO

First Department of Surgery,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. K. Orita)

Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) were isolated from various human cancers and cultured. The expansion, cytotoxicity, phenotype, and perforin, which is considered the cytotoxic factor of killer cells, of TIL were examined. TIL cultured in 1000u/ml recombinant interleukin-2 (rIL-2) with 20% conditioned medium (CoM) exhibited far better expansion capability than that of TIL cultured in rIL-2 1000u/ml alone, and continued to expand up to 14 weeks. The maximal expansion index (EI) was 23912. When TIL arrested expansion during the culture, the addition of PHA restored the ability to expand. The CoM was composed of spent medium from a 3-day culture of peripheral blood mononuclear cells from cancer patients. The lymphokine-activated killer (LAK) cells induced by the culture was utilized for clinical adoptive immunotherapy in our department. Cytotoxicity against K562 and Daudi target cells was highest at 2 to 3 weeks, and disappeared between 4 and 7 weeks of culture. The phenotype of fresh TIL was mainly CD3⁺ T cells, predominantly CD4⁺ cells, but CD8⁺ cells became predominant in long term culture. The frequency of IL-2R⁺ and HLA-DR⁺ cells was correlated with the expansiveness of TIL. The appearance and intensity of perforin positive cells were associated with the level of cytotoxicity of cultured TIL.